

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-187030

(43)Date of publication of application : 04.07.2000

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/15  
A61K 7/06

---

(21)Application number : 11-008578

(71)Applicant : POLA CHEM IND INC

(22)Date of filing : 18.01.1999

(72)Inventor : YAMAMOTO TAKUYA

SHISHIDO MAYUMI

SHAKU MASAO

SUZUKI MASAMI

---

(30)Priority

Priority number : 10021520    Priority date : 19.01.1998    Priority country : JP

---

(54) HAIR GROWTH AGENT EVALUATING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To establish an in vitro method for evaluating a hair growth agent having high correlation with in vivo by making hair papilla cells and hair follicle cells of animals coexist, culturing them, and taking the degree of their multiplication as an index.

SOLUTION: Hair papilla cells and hair follicle cells of animals are made to coexist and cultured, and the degree of their multiplication is taken as an index. Animals with hair is used without any special limit as animals to be used, and mice, rats, etc., can be, for example, used. Especially from rats, it is easy to extract hair papilla cells and hair follicle cells, the reproducibility of evaluation is satisfactory, and they are inexpensive and easy to acquire. The use of whiskers, from which it is convenient to extract hair papilla cells and hair follicle cells aseptically and which is superior in correlation in screening and accuracy, is desirable as hair to be used. In a method to extract hair papilla cells and hair follicle cells from whiskers of rats, labial parts on both right and left sides are aseptically cut out by a scalpel, and hair follicles in a growth period are extracted under a microscope and cut immediately above bulb parts of hair. Then hair papillae from the bulb parts of hair are cut out and cultured.

---

LEGAL STATUS

**BEST AVAILABLE COPY**

[Date of request for examination] 12.01.2006

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2000-187030  
(P2000-187030A)

(43) 公開日 平成12年7月4日 (2000.7.4)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード (参考)
G 0 1 N 33/15		C 0 1 N 33/15	Z
A 6 1 K 7/06		A 6 1 K 7/06	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願平11-8578	(71) 出願人	000113470 ポーラ化成工業株式会社 静岡県静岡市弥生町 6 番48号
(22) 出願日	平成11年1月18日 (1999. 1. 18)	(72) 発明者	山本 卓也 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ 化成工業株式会社戸塚研究所内
(31) 優先権主張番号	特願平10-21520	(72) 発明者	矢戸 まゆみ 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ 化成工業株式会社戸塚研究所内
(32) 優先日	平成10年1月19日 (1998. 1. 19)	(72) 発明者	釈 政雄 神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ポーラ 化成工業株式会社戸塚研究所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 育毛剤の評価法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、イン・ビボとの相関性が高いイン・ビトロの育毛剤の評価法を提供することを課題とする。

【解決手段】 動物の毛乳頭細胞と毛包細胞とを共存させて培養し、その増殖の度合いを指標とし、育毛剤をイン・ビトロで評価する。本発明によれば、イン・ビボとの相関性が高いイン・ビトロの育毛剤の評価法を提供することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物の毛乳頭細胞と毛包細胞とを共存させて培養し、その増殖の度合いを指標とすることを特徴とする、育毛剤のイン・ビトロの評価法。

【請求項2】 毛乳頭細胞と毛包細胞が髭由来の細胞であることを特徴とする、請求項1に記載の育毛剤のイン・ビトロの評価法。

【請求項3】 更に、毛包細胞のみを単独培養させて、この増殖の度合いを測定し、共存下での培養との差を指標とすることを特徴とする、請求項1又は2に記載の育毛剤の評価法。

【請求項4】 イン・ビボとの相関性が良好であることを特徴とする請求項1～3の何れか一項に記載の育毛剤の評価法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、育毛作用を有する物質のスクリーニングに好適な、育毛剤のイン・ビトロの評価法に関する。

【0002】

【従来の技術】美しい黒髪を長い間維持しうることは、万人誰もが願うことであるが、必ずしも実現しうるものではない。特に、近年に於いては、著しい食生活の変化、行動パターンの夜行化に伴うサーカディアンリズムの変調、社会生活に於ける競争の激化とそれを起因とする心身への負荷ストレスの増大などが複雑に関連して、禿、薄毛等の毛髪トラブルが急激に増大している。これを反映して、この様な毛髪トラブルに対処する育毛化粧品が各種開発されているが、十分にこの様な毛髪トラブルに対処しているとは言えず、更なる育毛用の化粧品の登場が待たれていた。この為には、新規の育毛素材の開発が必要となる。

【0003】育毛素材の開発は、各種生薬などを、例えば、マウス等の実験動物の皮膚に投与して、毛髪の生え方を指標としてイン・ビボの試験によって評価してきた。しかしながら、この様なスクリーニング法では、非常に多くの動物を用いなければならず、動物愛護の観点での問題があったり、評価に要する時間が非常に長いという問題があり、こなせるサンプルの数も自ずと限られていた。イン・ビトロの育毛剤の評価法としては、毛包細胞を培養し、その増殖の度合いを指標とする評価法が知られているが、この方法ではイン・ビボとの相関性に問題ある場合があり、一次スクリーニングとしてしか使用できないと言う問題があった。又、一方発毛に於ける、毛包細胞と毛乳頭細胞の相互関係については、明確な関係が見いだされていなかった。更に、毛乳頭細胞と毛包細胞を共存して培養する共存培養系で育毛剤の評価に於いて、単独培養系ではスクリーニングで引っかけることのできなかったイン・ビボ評価で有効な物質が引っかけられることは全く知られていなかった。この様な状

況を反映して、簡便で素早く評価ができ、多くのサンプルのスクリーニングが可能な、イン・ビボとの相関性が高いイン・ビトロの育毛剤の評価法が望まれていた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明はこの様な状況を踏まえて為されたものであり、イン・ビボとの相関性が高いイン・ビトロの育毛剤の評価法を提供することを課題とする。

【0005】

【課題の解決手段】本発明者らは、この様な状況に鑑みて、イン・ビボとの相関性が高いイン・ビトロの育毛剤の評価法を求めて鋭意研究を重ねた結果、動物の毛乳頭細胞と毛包細胞とを共存させて培養し、その増殖の度合いを指標とすることにより、その様なイン・ビトロの評価が可能となることを見だし、発明を完成させるに至った。以下、本発明について、発明の実施の形態を中心に詳細に説明を加える。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の育毛剤のイン・ビトロの評価法は、動物の毛乳頭細胞と毛包細胞とを共存させて培養し、その増殖の度合いを指標とすることを特徴とする。ここで使用する動物としては、毛髪を有する動物であれば特段の限定なく使用することができ、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ何れの動物も使用可能である。この中で特に好ましい動物は、ラットである。これは、毛乳頭細胞や毛包細胞の採取が行いやすい、評価の再現性が良い、安価で入手しやすい等の多くの利点を有する為である。又、使用する毛髪としては、髭を使用するのが好ましい。これは、毛包細胞や毛乳頭細胞を無菌的に取り出すに都合が良いことと、スクリーニングに於ける相関性と精度に優れる等の利点を有するためである。ラットの髭より毛乳頭細胞や毛包細胞を取り出す方法は、例えば、次の通りである。即ち、毛乳頭細胞は、ラットより左右両側の口唇部を無菌的にメスで切り出し、実体顕微鏡下で成長期の髭毛包を摘出し、当該毛包を毛球部の真上で切断し、毛球部からは毛乳頭を切り出し、これらを通常の細胞培養手段に従って培養すればよい。又、毛包細胞は、外毛根鞘部を含む部分の毛包外殻をメス及び26Gの注射針を用いて注意深く取り除き、1mg/mlコラゲナーゼ/デイスパーゼ中で処理した後、結合組織鞘を取り除き、トリプシン処理して細胞を集め、培養すればよい。これらについては、小林らが既に報じている。(Proc. Natl. Acad. Sci. 90:7391-7395, 1993) 培養は、例えば、ウシ胎仔血清を加えたイーグルの最少培地で培養すればよい。必要に応じて、EGF、インシュリン、ハイドロコルチゾン等を添加することもできる。かくして、得られた毛乳頭細胞と毛包細胞とを共存下、スクリーニングすべき素材を存在させて培養し、その増殖の程度を測定し、増殖を促進すれば、育毛剤として評価でき、その増殖の促

進作用が大きければ大きいほど育毛効果の大きい育毛剤である評価できる。この方法については、既に藤江らが報じているが、藤江らの報告には、育毛素材の非存在下の単独培養と共存培養に於いては、共存下の方が毛包細胞の増殖が促進されることが報じられているが、育毛素材の存在下で単独培養と共存培養の差が更に増幅されることは述べられていない。ここで、共存下とは、両細胞が影響を及ぼし合う環境にあることを言い、別々のシャーレにあっても、寒天ブリッジ等でメーディーエーター類を交換しうる環境にあれば共存下ということができる。後記実施例に示すように、毛乳頭細胞と毛包細胞とを共存させることにより、育毛剤であって、どちらか一方では増殖促進を認めない物質でも、共存下にあることにより増殖促進作用を呈し、確実に実状に則したスクリーニングをすることができる。これらの細胞の増殖の測定は、常法に従って行えば良く、例えば、 $^{14}\text{C}$ や $^3\text{H}$ 等の放射性元素でラベルした、チミジン等の必須成分の取込量を調べる方法などが例示できる。最も好ましいものは、 $^3\text{H}$ でラベルしたチミジンの取込量を調べる方法である。

#### 【0007】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明について更に詳細に説明を加えるが、本発明がこれら実施例にのみ限定を受けないことは言うまでもない。

【0008】＜実施例1＞21日齢のウィスター系ラット（雄性）を用い、毛包細胞と毛乳頭細胞とを単離した。即ち、ラット1匹分の左右両側の口唇部を無菌的にメスで切り出し、実体顕微鏡下で成長期の髭毛包20本を摘出した。摘出した毛包を毛球部の真上で切断し、毛球部からは毛乳頭を取り出し、直径3.5mmの組織培養用ディッシュに付着させて静置培養した。培地は最初の4日間は20%FBS加イーグルの最少培地で培養した。その後10%FBS加イーグルの最少培地で培養した。継代培養は、培養4週間後に燐酸緩衝生理食塩水：カルシウム、マグネシウムフリー（以下、PBS（-））でディッシュ表面を1回洗浄した後0.25%トリプシン-1mM EDTAで37℃、1時間処理し、細胞を分散させて遠心分離で回収したものを用いた。毛包細胞は、外毛根鞘部を含む部分の毛包外殻をメス及び注射針で注意深く取り除き、1mg/mlコラゲナーゼ/ディスパーゼ中で37℃、30分間処理した後、結合組織鞘を取り除き、0.05%トリプシン-0.53mM EDTAで1時間処理し、分散した細胞を遠

心分離で集め、コラーゲンコートディッシュに播種し培養した。培地は、ヒトリコンビナントEGF10ng/ml、ヒトリコンビナントインシュリン4μg/ml、ハイドロコルチゾン0.4μg/ml、15%FBS加イーグルの最少培地を用いた。継代培養は、培養2週間後に燐酸緩衝生理食塩水：カルシウム、マグネシウムフリー（以下、PBS（-））でディッシュ表面を1回洗浄した後0.25%トリプシン-1mM EDTAで37℃、1時間処理し、細胞を分散させて遠心分離で回収したものを用いた。培養は全て5%炭酸ガス、95%エアで37℃で行った。

【0009】共存培養は、継代培養2回目でサブコンフルエントになった、毛包細胞をI型コラーゲンコートプレートに2×102個/cm<sup>2</sup>の割合で播種し、同じく継代培養2回目のサブコンフルエントになった、毛乳頭細胞をI型コラーゲンコートセルカルチャーインサート（ポアサイズ3μm）に、4×103個/cm<sup>2</sup>の割合で播種した。培養24時間にセルカルチャーインサートをプレートのウェルに移し、それぞれ共存させて培養した。培養培地には、育毛効果がイン・ビボで確かめられているサンシャエキスを終濃度0%、10-7%、10-5%、10-3%で含んだ10%FBS加イーグルの最少培地を用いた。共存培養3日後にセルカルチャーインサートを除き、 $^3\text{H}$ -チミジン1μCi/mlを添加し更に5時間培養を続けた。常法に従って細胞内に取り込まれた放射性を測定し増殖活性とした。比較として、セルカルチャーインサートをインサートしないものを用い、単独培養とした。結果を図1に示す。これより、単独培養では、育毛剤であるサンシャエキスの育毛効果は認められないが、共存培養でははっきりと有意差をもってサンシャエキスの育毛効果が認められていることがわかる。又、細胞の起源が同一動物であるので、動物差を考えずに比較することもできるし、マイクロプレートでスクリーニングできるので、同一条件で多種のサンプルのスクリーニングを短時間で行うこともできる。

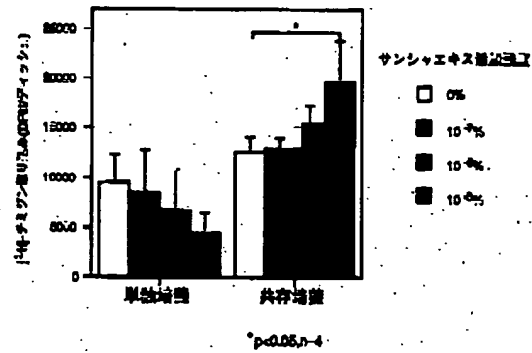
#### 【0010】

【発明の効果】本発明によれば、イン・ビボとの相関性が高いイン・ビトロの育毛剤の評価法を提供することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 サンシャエキスの育毛効果について、単独培養と共存培養で試験した結果を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 鈴木 正巳

神奈川県横浜市戸塚区柏尾町560 ボーラ

化成工業株式会社戸塚研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**